

分类号\_\_\_\_\_

密级\_\_\_\_\_

U D C\_\_\_\_\_

编号\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

胶质瘤迁移侵袭关键 miRNA 的筛选及 miR200c  
功能的初步鉴定

陈 玉 英

工作完成日期 2011 年 3 月 12 日

报告提交日期 2011 年 3 月 31 日

厦 门 大 学

二零一一年 三 月

# 胶质瘤迁移侵袭关键 miRNA 的筛选及 miR200c 功能的初步鉴定

Screening the key miRNA associated with glioma cell migration  
and invasion and identification the function of miR200c

博 士 后 姓 名 : 陈 玉 英

流动站（一级学科）名称 : 厦门大学生命科学学院

专 业（二级学科）名称 : 分子肿瘤学

研究工作起始时间 2009 年 1 月

研究工作期满时间 2011 年 1 月

厦 门 大 学

二零一一年 三 月

## 厦门大学博士后研究工作报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（ ）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

# 目 录

中文摘要 .....	1
英文摘要 .....	3
论文正文 胶质瘤迁移侵袭关键 miRNA 的筛选及 miR200c 功能的初步鉴定	
前    言 .....	6
第一部分 侵袭迁移关键miRNA的获得及初步验证 .....	8
材料与方法 .....	9
结    果 .....	19
讨    论 .....	22
第二部分 miR-200c 的功能初步鉴定及其靶基因预测 .....	24
材料与方法 .....	24
结    果 .....	37
讨    论 .....	46
第三部分 miR-200 在胶质瘤迁移与侵袭中的作用及其在 PTEN_Pi3K/AKT	
信号中的分子机制 .....	51
研究目标 .....	52
技术路线 .....	53
讨    论 .....	54
参考文献 .....	56
致    谢 .....	61
文献综述一 microRNA 与神经胶质瘤的研究进展 .....	62
文献综述二 胶质瘤侵袭性相关 microRNA 研究进展 .....	69
文献综述三 胶质瘤侵袭相关因子及研究进展 .....	76
博士后期间发表论著及项目资助 .....	92

## 摘要

### 内 容 摘 要

脑胶质瘤是最常见的颅内原发性肿瘤，侵袭和转移是恶性肿瘤的主要特性。恶性胶质瘤的难治性很大程度取决于其侵袭性强的生物学特性，即恶性度越高，侵袭性越强。局部侵袭是脑胶质瘤的一个显著特征。

microRNA( miRNA)是近年来发现的一类长度为19~ 25个核苷酸的非编码小分子RNA。它主要通过与其靶基因mRNA 3'UTR完全或不完全配对，导致靶标mRNA降解或转录后翻译抑制，从而参与个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等生理过程。由于miRNAs可能调节数个信号通路，这些小RNAs的缺失或者异常表达可能与疾病密切相关，包括肿瘤。最近的研究表明，miRNAs可通过调控其靶基因参与的信号通路，调节肿瘤的形成和发展，发挥着类似于癌基因或抑癌基因的功能。多种不同类型的miRNAs在胶质瘤细胞中都有表达，可通过上调或下调相应的miRNAs诱导胶质瘤细胞的凋亡或抑制其增殖，或者影响其迁移侵袭。因此，研究胶质瘤细胞miRNAs的表达谱，找出调控胶质瘤细胞迁移侵袭关键的miRNA，有望逆转胶质瘤迁移侵袭特性，可能为胶质瘤的诊断和治疗提供新的策略。

因此，本课题通过microRNA array研究脑胶质瘤细胞与迁移侵袭相关miRNAs表达谱及其差异，找出了miR-200是与胶质瘤细胞迁移侵袭密切相关的关键miRNA，并初步验证miR-200c的功能及其靶基因。

## 方法

通过microRNA array研究脑胶质瘤细胞与迁移侵袭相关miRNAs; real-time PCR验证miRNA水平; 利用反义核酸技术抑制miR-200c水平; real-time PCR检测miRNA水平; MTT法检测miR-200c对U251细胞生长的影响; BrdU标记法检测miR-200c对U251细胞增殖的影响; 平板克隆形成实验检测miR-200c对U251增殖的影响; 细胞划痕实验检测miR-200c对U251细胞迁移的影响; Transwell实验检测miR-200c对U251细胞侵袭的影响; western Blot检测抑制miR-200c对PTEN、Akt水平的影响;

## 结果

1.miR-200a, miR-200b, miR-200c是与胶质瘤细胞迁移侵袭密切相关的关键miRNAs;

- 2.抑制miR-200c U251细胞生长显著被抑制;
- 3.抑制miR-200c U251细胞DNA合成显著下降;
- 4.抑制miR-200c U251细胞克隆形成显著下降;
- 5.抑制miR-200c U251细胞在transwell实验中迁移侵袭的细胞数目显著下降;
- 6.预测miR-200的靶基因有PTEN、Akt; 抑制miR-200c后, U251细胞中PTEN水平上调, Akt水平不变;

## 结论

1. miR-200c具有促进胶质瘤增殖迁移侵袭的作用;
2. miR-200是调节胶质瘤细胞迁移侵袭的关键miRNA;
3. miR-200的靶基因可能是PTEN;

## 关键词

胶质瘤; 侵袭; 迁移; microRNA; PTEN

## 英文摘要

### Abstract

Malignant gliomas are the most malignant and prevalent intracranial tumor. Despite recent advances in diagnostics and treatments, prognosis for advanced patients suffering from these diseases remains poor. One of the important reasons is that active cell migration and invasion of GBM cells ultimately lead to ubiquitous tumor recurrence and patient death. Although our understanding of GBM carcinogenesis has been steadily improving, the factors that mediate GBM invasion are still poorly understood. So it is important to understand dispersal mechanisms and characteristics of the invasive population.

MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous, small nonprotein coding single-stranded RNA molecules, which are crucial post-transcriptional regulators of gene expression. miRNAs regulate gene expression in a sequence-specific fashion; miRNAs bind to 3'untranslated regions (UTRs) of mRNAs and then affect the translation and/or stability of that mRNA, leading to a reduction in protein levels. Tumors analyzed by miRNA profiling have exhibited significantly distinct miRNA signatures compared to normal cells from the same tissue. The abnormal levels of miRNAs in tumors have important pathogenetic consequences. Some miRNAs are over-expressed in tumors and act as oncogenes, promoting tumor aggravation by down-regulating tumor suppressors. On the other hand, tumors lost miRNAs generally participate in oncogene overexpression. Recent evidence has indicated that some miRNAs can function as oncogenes as well as tumor suppressors. miRNAs are attractive candidates of upstream regulators in metastatic progression because they may regulate a number of invasion and metastasis-related genes. These findings will be useful in identifying potential candidates for targeted therapeutic intervention of GBM.

In this study, we evaluated the expression profile of miRNAs related to migration and invasion in human U87 and CHG-5 using miRNA microarray and identified miR-200 as a key miRNA associated with glioma cell migration and invasion, and

verified the function and target gene of miR-200c.

## **Methods**

The microRNAs related to migration and invasion of glioma were detected by microRNA array;

The level of miRNAs was detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) analysis;

The level of miR-200c was suppressed by antisense nucleic acids treatment;

Colony forming assay and MTT assay were used to detect the cell proliferation;

Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation analysis was used to detect synthesized DNA of proliferating cells;

Cell scratch assay was performed to detect cell migration, and cell invasion assay was performed using Transwell chambers;

The effect of miR-200c on the protein level of PTEN and Akt was detected by Western blotting analysis.

## **Results**

1. miR-200a, miR-200b, miR-200c were the key miRNAs related to migration and invasion of glioma;
2. Inhibition of miR-200c expression resulted in inhibited cell growth of U251 cells significantly;
3. Inhibition of miR-200c expression resulted in reduced synthesized DNA of U251 cells significantly;
4. Inhibition of miR-200c expression resulted in reduced Colony forming of U251 cells significantly;
5. Inhibition of miR-200c expression resulted in reduced cells of migration and invasion of U251 cells in transwell significantly;
6. The target gene of miR-200 were PTEN and Akt performed by Bioinformatics Analysis and Prediction of software. After significantly down-regulated miR-200c expression, the protein level of PTEN were up-regulated, and the protein level of Akt were not changed.



## **Conclusions**

1. miR-200c enhances cell proliferation ,migration and invasiveness of glioma;
1. miR-200 was the key miRNA related to migration and invasion of glioma;
2. The target gene of miR-200 maybe PTEN.

## **Key words**

glioma; invasion; migration; microRNA; PTEN

# 胶质瘤迁移侵袭关键 miRNA 的筛选及 miR200c 功能的初步鉴定

## 前言

脑胶质瘤是最常见的颅内原发性肿瘤，侵袭和转移是恶性肿瘤的主要特性。恶性胶质瘤的难治性很大程度上取决于其侵袭性强的生物学特性，即恶性度越高，侵袭性越强。局部侵袭是脑胶质瘤的一个显著特征。通常，胶质瘤都有一个中央坏死灶，周围是高致密的肿瘤细胞区。这些肿瘤似乎边界清楚，但组织学上，却发现局部侵袭。侵袭往往循着血管和有髓纤维路径侵袭，特别是后者。

microRNA( miRNA)是近年来发现的一类长度为19~ 25个核苷酸的非编码小分子RNA。它主要通过与其靶基因mRNA 3'UTR完全或不完全配对，导致靶标mRNA降解或转录后翻译抑制，从而参与个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等生理过程。由于miRNAs可能调节数个信号通路，这些小RNAs的缺失或者异常表达可能与疾病密切相关，包括肿瘤。最近的研究表明，miRNAs可通过调控其靶基因参与的信号通路，调节肿瘤的形成和发展，发挥着类似于癌基因或抑癌基因的功能。多种不同类型的miRNAs在胶质瘤细胞中都有表达，可通过上调或下调相应的miRNAs诱导胶质瘤细胞的凋亡或抑制其增殖，或者影响其迁移侵袭。因此，研究胶质瘤细胞miRNAs的表达谱，可能为胶质瘤的诊断和治疗提供新的策略。

### 1. 恶性胶质瘤呈浸润性生长，肿瘤细胞侵入周围脑组织，手术难以彻底清除，最终导致其复发，临床预后极差。

恶性胶质瘤发生率约占中枢神经系统肿瘤的45 %-50 %。早期发生沿血管外间隙、白质束、室管膜分布的浸润是其重要特征之一。尽管最近10年，恶性胶质瘤的综合治疗领域取得了一系列进展，但仍有多数患者在数年内复发，2年生存率不足30 %。手术切除是恶性胶质瘤首选的治疗方式。随着磁共振导航切除术、清醒开颅手术、荧光导航切除术等技术的应用，切除的准确度有所提高，然而由于其侵袭性生长方式、与周围正常脑组织界限模糊、尤其是侵入周围脑组织内的肿瘤细胞<sup>[1]</sup>，很难彻底清除，最终这些术腔附近的残留病变能够增殖并重建肿瘤。研究证实，若残留的肿瘤细胞数为 $10^8$ 个，至恢复到危及患者生命的 $10^{11}$ 个细胞，只需要70天左右。目前针对术后残留的肿瘤细胞，主要采用放疗、化疗等措施来加以杀灭，然而这些术后残留病变却对放疗、化疗等措施表现出显著的抵抗性，导致肿瘤复发，患者预后不佳。

### 2. microRNA可通过调控其靶标基因参与的信号通路，影响肿瘤的发生和发展，发挥着类似于癌基因或抑癌基因的功能。

近年来，一类调控性非编码小分子RNA (microRNAs, miRNAs) 倍受人们关注。miRNAs是一类19~25nt的小分子非编码单链RNA，其编码基因位于蛋白质编码基因

间，初始转录物形成60~80nt的茎-环状前体RNA（pre-miRNAs），经Dicer酶剪切茎-环单臂产生，通过与靶mRNA的3'非翻译区（3'-UTR）不完全互补配对，抑制蛋白质翻译过程。人类细胞中约1/3的蛋白编码基因受miRNA的调控<sup>[2]</sup>。

miRNAs具有如下特点<sup>[3-4]</sup>：①miRNAs参与恶性肿瘤发病机制，肿瘤细胞高表达和低表达的miRNAs分别具有癌基因和抑癌基因的功能，共同导致细胞生长失控、分化不良、凋亡受损、不断增殖而形成恶性肿瘤。②“纠正”细胞内异常表达的miRNAs，可诱导细胞生物功能发生逆转，因而miRNAs有望成为靶向治疗的新靶标<sup>[5,6]</sup>。③组织或细胞在某个特定阶段存在自身特异的miRNAs表达谱及序列特征，可作为其特征性分子标志，并决定细胞的分化方向和分化进程；④胚胎或成体细胞中存在特异的miRNAs，其在维持细胞自我更新和多向分化潜能中起着重要作用。由于miRNAs通常调控多个或一组具有相似功能的靶基因，这使得miRNAs用于靶向治疗时“天然”优于目前基因治疗中常常采用的单基因治疗手段。

### **3. miRNA与胶质瘤发生演进关系密切，找出调控胶质瘤细胞迁移侵袭关键的miRNA，有望逆转胶质瘤迁移侵袭特性。**

miRNA在脑组织中较丰富，在脑组织的发育和分化过程中起关键作用。在细胞分化过程中，miRNA起到建立并维持细胞固有特征的作用。同时miRNA还参与神经功能的实施，如突触可塑性：miRNA通过调控突触处的mRNA的翻译来维持突触可塑性。miRNA还能够参与细胞自我更新和分化过程，在肿瘤的发生发展过程中起重要作用。它们的异常表达与一些神经系统疾病有关，如胶质母细胞瘤，Tourette综合征等。

miRNAs参与恶性肿瘤发生发展<sup>[7]</sup>。有研究<sup>[8-10]</sup>发现，某些miRNAs影响恶性胶质瘤的生长、增殖和侵袭。鉴于此，我们推断，很可能存在调控脑胶质瘤细胞迁移侵袭特性的关键miRNAs，它们的异常表达是参与肿瘤细胞迁移侵袭重要分子机制之一，并成为脑胶质瘤细胞迁移侵袭特性重要调控因子。有报道，miRNA-10b介导乳腺癌的迁移侵袭<sup>[11]</sup>、并具有促进脑胶质瘤侵袭的作用<sup>[12]</sup>，这些研究极大的支持了我们的推测：存在调控脑胶质瘤细胞迁移侵袭特性的关键miRNA。因此，筛选脑胶质瘤细胞与迁移侵袭相关（乃至特异的）miRNAs表达谱，探明miRNAs在脑胶质瘤细胞迁移侵袭中的确切功能，是研究脑胶质瘤发生机制的新思路；而“纠正”脑胶质瘤细胞中异常表达的miRNAs水平，可有望逆转脑胶质瘤细胞的恶性表型，大幅度地减低其复发、改善患者的预后，并成为脑胶质瘤生物治疗的新策略。

## 第一部分 侵袭迁移关键 miRNA 的获得及初步验证

MicroRNAs(miRNAs)是一类分布广泛的小的非编码蛋白质的RNAs，其功能是负调控基因表达。它们调节了多种生物学信号通路，生物信息学数据显示，每个miRNA 可以调节数百个靶基因，这也表明miRNAs 可能影响所有的信号途径。最近的证据表明，miRNA 突变或者异位表达与多种人类癌症相关，miRNAs 可以起到肿瘤抑制基因或者癌基因的功能<sup>[13-15]</sup>。研究表明miRNAs 可以抑制重要的肿瘤相关基因的表达，可能在癌症的诊断和治疗中起重要作用。肿瘤是由于细胞不受控制的增殖，受到损伤的细胞不能正常死亡引起的。细胞有几种保护措施，保证在发育过程中和成体中的细胞通过一种协调的机制，进行正常的分裂，分化，和死亡。多种调控因子通过基因表达的开关，调节细胞分裂和分化。在肿瘤，被称为肿瘤抑制基因和癌基因表达失调。大多数肿瘤抑制基因和癌基因都是从DNA 转录成RNA，然后翻译成蛋白质，行使其生物学功能。最近的证据表明，非编码蛋白的RNA分子，被称为miRNAs，也可以起到肿瘤抑制基因和癌基因的作用。

### 1. miRNA 表达谱可能帮助肿瘤诊断

miRNA 表达谱可能帮助肿瘤诊断和预后<sup>[16]</sup>。Northern-blot 和芯片可以用来确定组织特异性的 miRNAs 表达。在特定的器官中观察到的独特的 miRNA 表达谱证明了发育过程中 miRNAs 在干细胞的维持和引导细胞分化中的重要作用。研究人员现在开始使用 miRNA 表达特征来对肿瘤进行分类，并且确定那些可以用来估计预后的 miRNA 标记。

肿瘤的 miRNA 表达特征反映了其发育起源，这也与 miRNAs 指导组织特异性发育功能相一致。整体来讲，miRNAs 可能与细胞进入分化程度更高的阶段有关，比如其可以是人进入老年的生物标记<sup>[17]</sup>。肿瘤和正常组织的 miRNA 表达谱差异代表了这些细胞的分化水平的差异，这些研究确定了 miRNAs 为“oncomirs”，暗示异常的 miRNA 表达可能导致去分化，引起肿瘤发生<sup>[18]</sup>。

一个确定多种肿瘤的 miRNA 表达谱特征库，可以帮助诊断和治疗肿瘤。由于 miRNAs 可以从福尔马林固定的石蜡包埋的样品中分离出来，这使得 miRNA 表达谱特征库建立成为可能。某些特定的 miRNAs 表达差异已经被证明可以用于精确的预测病人的预后。从治疗的角度，miRNA 表达谱可能为临床上确定一个治疗方案提供一个强有力的工具。

### 2. miRNA 可作为肿瘤的治疗手段

miRNAs 具有重要的肿瘤抑制基因的功能，可能会对肿瘤的基因治疗产生很大的影响。类似于上面比较肿瘤和正常组织的 miRNA 水平的方式，进行大范围的 miRNA 表达扫描，可以鉴定肿瘤有关的新的 miRNA。有研究者设计实验对 miRNA 进行功能扫描，确定那些特异性的控制细胞增殖、凋亡的 miRNA 基因。未来，引入与具有癌基因

特性的 miRNA 互补的合成反义寡聚核苷酸——抗 miRNA 寡聚核苷酸(AMOs)——可能有效的灭活肿瘤中的 miRNAs, 延缓其生长。临床上, 可以通过经常的或者持续的 2'-O-甲基化或者锁核酸(LNA)等修饰的反义寡聚核苷酸给药使 miRNA 失活。这些修饰使得寡核苷酸更稳定, 比其他治疗手段毒性更低。

由于多种不同类型的miRNAs在胶质瘤细胞中都有表达, 可通过上调或下调相应的 miRNAs诱导胶质瘤细胞的凋亡或抑制其增殖, 或者影响其迁移侵袭<sup>[19]</sup>。因此, 研究胶质瘤细胞miRNAs的表达谱, 可能为胶质瘤的诊断和治疗提供新的策略。

基于此, 本课题拟通过microRNA array筛选脑胶质瘤细胞与迁移侵袭相关miRNAs表达谱及其差异。由于临床胶质瘤组织的个体差异大, 即取同一级别的不同患者的胶质瘤组织, 其间的miRNAs表达谱也具有很大差异, 而细胞的特性相对更稳定, 同一细胞系的miRNAs表达谱差异小, 实验的重复性好。因此我们选取低级别与高级别脑胶质瘤细胞进行microRNA array分析。

## 材 料 方 法

### 一、材 料

脑胶质瘤细胞株: 人脑胶质瘤母细胞 U87 细胞株 (WHO 分级为IV级) 购于上海细胞研究所, 人脑胶质瘤 CHG-5 细胞株 (II级) 为第三军医大学病理科卞修武教授惠赠。细胞用 DMEM 高糖培养基培养, 含 10%小牛血清, 用 0.25%胰酶消化传代。

### 二、主要仪器设备和试剂

#### 1.主要仪器设备

超净工作台	安泰公司	中国
CO <sub>2</sub> 培养箱	Thermo Forma	美国
倒置显微镜	Olympus	日本
5415D 离心机	Biofuge 22R	德国
5417R 低温离心机	Biofuge 22R	德国
长风水浴箱	北京长风	中国
台式离心机	Sigma	美国
台式低温高速离心机	Biofuge 22R	德国
培养板	Costar	美国
电子天平	上海安亭	中国
超低温冰箱	Thermo Forma	美国
紫外分光光度计	Bio-Rad	美国
pH 计(828 型)	Orion	美国
纯水机	Millipore	法国

Minicycler PCR 仪	Bio-Rad	美国
Bio-RAD 梯度 PCR 仪	Bio-Rad	美国
Real-Time PCR Detection System MJ Research		美国
凝胶成像分析系统	Bio-Rad	美国
垂直电泳槽	Bio-Rad	美国

## 2.主要试剂

甘氨酸	Sigma	美国
DMEM(高糖)	Gibco	美国
DMSO	Sigma	美国
小牛血清	杭州四季青	中国
Taq 酶	TaKaRa	日本
AMV 逆转录酶	BioFlux	中国
RT-PCR 试剂盒	TaKaRa	日本
High pure miRNA 抽提试剂盒	Roche	德国
SYBR Premix EX TaqTM (Perfect Real Time)	TaKaRa	日本
miRNA Marker	Sigma	美国
Trizol	Invitrogen	美国
DEPC	上海生工	中国
PCR 引物	赛百胜	中国
RNA 酶	北京中杉	中国
EB	深圳晶美	中国
氯仿	厦门化试公司	中国
乙酸钠	厦门化试公司	中国

## 3.主要试剂的配制

(1) PBS (0.01mol/L, pH 7.4): NaCl 8.00 g, KCl 0.20 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.20 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.49 g, 1 000 ml 三蒸水溶解, 室温保存。

(2) DMEM高糖培养液: DMEM高糖培养基干粉13.4 g,  $\text{NaHCO}_3$  3.7 g, 溶于1000 ml三蒸水中, 混匀, 用0.1 mol/L NaOH及0.1 mol/L HCl调pH至7.3, 0.22  $\mu\text{m}$ 膜过滤除菌, 分装, -20  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(3) 0.25 %胰酶溶液: 精制胰蛋白酶0.25 g, 溶于100ml PBS液中, 混匀, 0.22  $\mu\text{m}$ 无菌过滤器过滤除菌, 分装, -20  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(4) DEPC处理水: 加100  $\mu\text{l}$  DEPC于100 ml水中, 使DEPC的体积分数为0.1%。剧烈摇动, 使其充分溶解, 室温放置24小时, 高压灭菌, 4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存。

(5) 75%乙醇: 用无水乙醇加 DEPC 水配, 然后放-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存(其中 DEPC 水需先高

压消毒)

(6) 50×TAE 电泳缓冲液: Tris 碱 242.0 g, 冰乙酸 57.1 g, 0.5 M EDTA 100.0 ml, 加蒸馏水至 1 000 ml, 使用时稀释 50 倍。

(7) 2.0%琼脂糖凝胶的配制: 2.0 g 琼脂糖+100 ml 1×TAE 电泳缓冲液, 微波炉中火 3 min 至沸腾, 熔化的琼脂物冷却至 60℃左右时加入 10 mg/ml 溴化乙锭 8.0 ul, 充分混匀, 将温热的凝胶倒入已置好梳子的胶膜中, 在室温下放置 30-45 min 后现进行电泳。

### 三、实验方法

#### (一) 收集细胞, 预处理, 送公司

##### 1. 冻存细胞复苏及传代培养

- (1) 从液氮中取出细胞冻存管, 直接投入 37℃温水中, 并不时摇动使其尽快融化。
- (2) 在超净台上打开瓶盖, 用吸管吸出细胞悬液, 加入培养瓶中, 补充加入含 10% 小牛血清 DMEM 高糖培养液培养液约 5 ml。
- (3) 混匀后转入离心管中低速离心(500-1000 rpm)3 分钟, 弃去上清液, 再加入完全培养基 1-2 ml, 将其移至培养瓶中, 补完全培养液至 5 ml。
- (4) 倒置显微镜下细胞计数后, 放入湿度 100%、温度 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。
- (5) 每 3-4 天换配养液一次。当细胞数达到 80%-90%瓶底融合度时进行传代培养。
- (6) 选生长融合度为 80%-90%的细胞, 弃培养瓶内的旧培养液。
- (7) 用 37℃ PBS 液 3-4 ml 轻轻冲洗细胞后将 PBS 倒尽, 加入 0.25%胰酶溶液 1 ml。
- (8) 镜下观察待细胞回缩, 细胞间隙增大时终止消化。
- (9) 弃胰酶溶液, 加入含 10%小牛血清 DMEM 高糖培养液 5-10 ml, 用吸管吹打使细胞悬浮。
- (10) 细胞悬液转如离心管, 低速离心, 倾去上清, 以培养液重新悬浮细胞。以 1:2 至 1:5 比例分装到无菌培养瓶中, 继续培养。
- (11) 以后每 2-3 天换液 1 次, 视接种的细胞密度不同而再次消化传代。

##### 2. 处理细胞, 送公司

常规培养上述 2 种细胞, 胰酶消化, 分别收集对数生长期  $2 \times 10^6$  细胞, PBS 洗涤, 离心, 溶于 Trizol 中, -20℃保存, 干冰运输至北京博奥生物公司, 委托其完成 microRNA array, 采用 Affymetrix miRNA 表达谱芯片检测。

#### (二) AFFX MiRNA 表达谱芯片实验 Protocol

##### 1. Affymetrix miRNA 芯片实验主要试剂与仪器

1) 总RNA提取试剂: Trizol试剂 (Invitrogen, P/N 15596-018); MirVana® miRNA 提取试剂盒 (Ambion, AM1560);

2) 单次循环靶标试剂盒: Affymetrix® GeneChip® miRNA 阵列 FlashTag™ Biotin RNA 标记试剂盒(Genisphere, FT30AFYB) ; 控制杂交试剂盒Hybridization Control Kit (Affymetrix, P/N 900454) ;

3) 洗脱和染色试剂:

水, 分子生物级别 (BioWhittaker Molecular Applications / Cambrex, P/N 51200 )

蒸馏水 (Invitrogen公司, P/N 15230-147)

牛血清白蛋白溶液 (50 mg/mL), Invitrogen 公司, P/N 15561-020

R-Phycoerythrin Streptavidin,分子探针, P/N S-866

5M NaCl, RNase-free, DNase-free, Ambion, P/N 9760G

20×SSPE (3M NaCl, 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02M EDTA), BioWhittaker 分子公司 / Cambrex, P/N 51214

山羊IgG, Sigma-Aldrich, P/N I 5256

抗链菌素抗体 (羊), P/N BA-0500

Surfact-Amps 20 (Tween-20), 10%, Pierce Chemical, P/N 28320

4) 仪器

Affymetrix® Hybridization Oven 640

Affymetrix® Fluidics Station 450

Affymetrix® GeneChip® Scanner 3000

5) 软件: Affymetrix® GeneChip® Command Console™ 1.1

## 2. AFFX MiRNA表达谱芯片实验方法步骤

### 2.1 靶标制备

#### 2.1.1材料

表1 试剂

试剂	目录号	规格	生产厂家	贮存条件
FlashTag	FT30AFYB	30 Assays	Genisphere	-20℃
1mM Tris Cl	N/A	100ml	Capitalbio	4℃

表 2 仪器设备

仪器	型号	生产厂家
PCR仪	PTC-225	MJ
紫外分光光度计	ND-1000	NanoDrop
凝胶成像仪	CBC/UVP I-D001	CapitalBio

#### 2.1.2 操作步骤

##### 2.1.2.1 稀释ATP Mix



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库